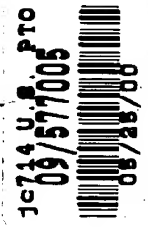


日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

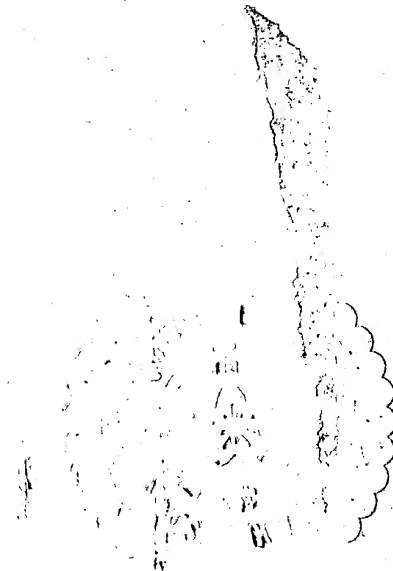
1998年 9月25日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第271787号

出 願 人
Applicant(s):

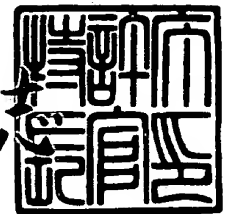
味の素株式会社



1999年 8月 4日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3054912

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1E0624

【提出日】 平成10年 9月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 GDH遺伝子用変異型プロモーター配列、該プロモーター配列を持つGDH遺伝子及び該遺伝子を有するコリネバクテリア菌株

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内

 【氏名】 朝倉 陽子

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内

 【氏名】 中村 純

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内

 【氏名】 木村 英一郎

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内

 【氏名】 松井 和彦

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社内

 【氏名】 大住 剛

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社

発酵技術研究所内

【氏名】 中松 亘

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 宍戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 GDH遺伝子用変異型プロモーター配列、該プロモーター配列を持つGDH遺伝子及び該遺伝子を有するコリネバクテリア菌株

【特許請求の範囲】

【請求項1】 -35領域に CGGTCA、TTGTCA、TTGACA及び TTGCCA からなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列及び／又は-10領域にTATAAT配列若しくは該配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有することを特徴とするグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）産生遺伝子用プロモーター。

【請求項2】 請求項1記載のプロモーターを有するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子。

【請求項3】 請求項2記載の遺伝子を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コリネバクテリア菌株にグルタミン酸を高収率で生産する能力を付与することができるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）産生遺伝子（グルタミン酸脱水素酵素遺伝子）用プロモーター、該プロモーター配列を持つGDH遺伝子及び該遺伝子を有するコリネバクテリア菌株に関するものである。

【発明の背景】

特開昭61-268185号公報には、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子を含むDNA断片（A）と細胞内での自立複製に必要な遺伝子を含むDNA断片（B）とを含む組換え体DNAが開示されており、この組換え体DNAを細胞に導入することによって、GDH強化株を育種することができ、微生物による物質（アミノ酸、蛋白質等）生産を改善できることが開示されている。

【0002】

これに対して、特許第2520895号公報には、上記組換え体DNAをコリ

ネバクテリウムに移入して該酵素活性が強化された菌株を作成し、この菌株を用いて醗酵法によりL-グルタミン酸を製造したが、その生産量や収率はまだまだ満足のいくものではなく、更にL-グルタミン酸の生産性を向上させることが望まれているとしている。そして、この要望は、グルタミン酸生産性コリネ型細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子とイソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ICDH）の2種の遺伝子を含む組換え体DNAをグルタミン酸生産性コリネ型細菌に移入することにより、達成できたとしている。

【0003】

一方、特表平6-502548号公報には、コリネバクテリア菌株と、該菌株中の発現のための第一機能性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび／または蛋白質をコードする第二DNA配列、及び上記第一及び第二DNA配列の間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、該第三DNA配列が該コリネバクテリア菌株によりアミノ酸、ポリペプチドおよび／または蛋白質の分泌を保証するPS1又はPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードすることを特徴とするコリネバクテリアの発現及び分泌系が開示されている。具体的には、ポリペプチドの分泌が開示されており、コリネバクテリア菌株にNTG変異誘発を施し、グルタミン酸アナログである4-フルオログルタミン酸4-fluoroglutamate（4FG）に対して耐性を与える変異株を選び、これをpCGL141での形質転換に付しており、上記アナログ耐性菌の中からGDHの発現が強化された株が取得できることが開示されている。ここでは、GDHプロモーターのヌクレオチド配列251～266に変異が生じていることが示されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、副生アスパラギン酸およびアラニンの著しい増加を引き起こすことなく、コリネバクテリア菌株にグルタミン酸を高収率で生産する能力を付与することができるGDH用プロモーターを提供することを目的とする。

本発明は、又、上記GDH用プロモーター配列を持つGDH遺伝子を提供することを目的とする。

本発明は、又、上記遺伝子を有するL-グルタミン酸生産性コリネバクテリア

菌株を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、これまでに知られているGDH用プロモーターの特異的領域である-35領域及び／又は-10領域に特定の変異を起こさせると、上記課題を効率的に解決できるとの知見に基づいてなされたのである。

すなわち、本発明は、-35領域にCGGTCA、TTGTCA、TTGACA及びTTGCCAからなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列及び／又は-10領域にTATAAT配列若しくは該配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有することを特徴とするグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)産生遺伝子用プロモーターを提供する。

本発明は、又、上記プロモーターを有するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ産生遺伝子を提供する。

本発明は、又、上記遺伝子を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌を提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

コリネ型グルタミン酸生産菌のGDHはそれ自身のプロモーター配列をその上流域に持つことが明らかになっている(Sahm et al. Molecular Microbiology(1992), 6, 317-326)。本発明でいうコリネ型グルタミン酸生産菌とは、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41; 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。したがって、本発明で使用する変異株は、ブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属に属する下記のようなコリネ型グルタミン酸生産菌から誘導することができる。尚、本明細書において、グルタミン酸生産性に言及しない場合は、コリネバクテリウム属細菌及びブレビバクテリウム属細菌を単にコリネ型細菌ということがある。

【0007】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
ブレビバクテリウム・ディバリカタム	ATCC14020
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC13869
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC15990
ブレビバクテリウム・フラバム	ATCC14067
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
ブレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC14068
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス	AJ12340(FERM BP-1539)

【0008】

本発明のGDH用プロモーター、該GDH用プロモーター配列を持つGDH遺伝子及び該遺伝子を有するL-グルタミン酸生産性コリネバクテリア菌株は、例えば次のようにして得ることができる。

つまり、上記のような菌株に紫外線照射、X線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の変異処理を施し、4-フルオログルタミン酸を含有する寒天平板培地上で、4-フルオログルタミン酸に対して耐性を有する菌株を得る。すなわち、親株の生育を抑制する濃度の4-フルオログルタミン酸を含有する寒天平板培地上に変異処理を施した菌株を塗布し、生育してきた変異株を分離すればよい。

又、GDH遺伝子のプロモーター配列を部位特異的変異法を用いて各種変異を導入した配列に置換したものを多数作製し、それぞれの配列とGDH活性との関係を調べて、L-グルタミン酸生産性の高いものを選択することができる。

【0009】

本発明では、特に、GDH遺伝子のプロモーターの-35領域のDNA配列がCGGTCA、TTGTCA、TTGACA及びTTGCCAからなる群から選ばれる少なくとも一種の

DNA配列となっているか、及び／又は該プロモーターの-10領域のDNA配列がTATAATとなっているか、若しくは-10領域にTATAAT配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列となっているものが好ましい。-10配列のTATAAT配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列となっているものを選択できるのは、野生型の-10配列であるCATAATの最初の「C」を「T」に代えただけで劇的にGDH比活性の上昇が観察されたので（表1、p6-4参照）、他の塩基にかえてもかわらないと考えられるからである。

GDH遺伝子のプロモーター配列は、例えば、前出のSahm et al. *Molecular Microbiology*(1992), 6, 317-326に記載されており、又、配列番号1に記載されている。又、GDH遺伝子自体の配列は、例えば、同じくSahm et al. *Molecular Microbiology*(1992), 6, 317-326に記載されており、又、配列番号1に記載されている。

【0010】

本発明のコリネ型L-グルタミン酸生産菌を、液体培地に培養し、培地中にL-グルタミン酸を生成蓄積させ、これを該培地から採取することによりL-グルタミン酸を得ることができる。

本発明において上記菌株の培養に用いられる液体培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類、生育因子等を含有する通常の栄養培地が用いられる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、廃糖蜜、澱粉加水分解物等の炭水化物、エタノール、グリセロール等のアルコール類、酢酸等の有機酸類が使用される。窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー等が使用される。栄養要求性を有する変異株を用いる場合には、それらの要求物質を標品もしくはそれを含有する天然物として添加するのがよい。

コリネ型細菌は一般に、ビオチン制限下でL-グルタミン酸を生産する。従って、培地中のビオチン量を制限するか、界面活性剤やペニシリンなどのビオチン作用抑制物質を添加する。

発酵は、振とう培養や通気攪拌培養等による好気条件下にて、培養液のpHを5～9の間に保持しつつ2～7日間行うのがよい。pHの調節には、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス、アンモニア水等を用いるのがよい。培養温度は24～37℃であるのが好ましい。

【0011】

培養液中に生成蓄積したL-グルタミン酸の採取は常法によって行えばよく、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等にすることができる。具体的には、L-グルタミン酸を陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるか、または中和晶析させればよい。

【発明の効果】

本発明によれば、副生アスパラギン酸およびアラニンの増加を引き起こすことなく、コリネバクテリア菌株にグルタミン酸を高収率で生産する能力を付与することができるGDH用プロモーターを提供することができる。

次に実施例により本発明を説明する。

【0012】

【実施例】

実施例1：変異型GDHプロモーターの作製

部位特異変異法を用い：次の方法で変異型GDHプロモーターを調製した。

(1) 各種変異型のプロモーターを持つGDH遺伝子の作製

コリネ型細菌のGDH遺伝子のプロモーターの-35領域および-10領域の野生型配列を配列1に示す。但し、野生型のプロモーター配列は既に報告されている(Molecular Microbiology (1992), 6, 317-326)。

変異型プロモーターを持つGDH遺伝子を運ぶプラスミドの作製方法は、以下の通りである。図1に示すようにコリネ型細菌野生株ATCC13869株の染色体遺伝子を鋳型とし、GDH遺伝子上流と下流とでPCRにより遺伝子を増幅し、ブランチングし、両端を平滑末端化した後に、それをプラスミドpHSG399(宝酒造社製)のSmaI部位に挿入した。次にこのプラスミドのSalI部位に、コリネ型細菌で複製可能な複製基点をもつプラスミドpSAK4から取得した複製起点を導入することによりプラスミドpGDHを作製した。この方法において、GDH遺伝

子の上流側のプライマーとして配列表1から6に示す配列を持つプライマーを用いることにより、上記のおおの 프로모ーター配列を持つGDH遺伝子を作製することが出来る。なお、ここで用いたPCR増幅断片中には導入したプロモーター配列内の変異以外は変異は導入されていないことを塩基配列の決定により確認した。pSAK4を構築するためには、既に取得されているコリネバクテリウム属細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519(Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984))由来の複製起点を持つプラスミドpHK4(特開平5-7491号)を制限酵素BamHI及びKpnIで消化して、複製起点を含むDNA断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット(宝酒造社製、Bluntingkit)を用いて平滑末端化した後SalIリンカー(宝酒造社製)を結合し、これをpHSG299のSalIサイトに挿入した。得られたプラスミドがpSAK4である。

【0013】

(2) 各プロモーター配列を有するGDHの発現量の比較

上記の様に作製したプラスミドをコリネ型細菌野生株ATCC13869株にそれぞれ導入した。導入の方法はエレクトロポレーション法を用いた(特開平2-207791号公報参照)。作製したこれらの菌株のGDHの発現量を比較するために、GDHの比活性を調べた。活性測定方法は上記のSahm等の方法に従った。その結果を表1に示す。

【0014】

【表1】 表1

菌 株	プロモーター配列		GDH比活性	相対値
	-35	-10		
ATCC 13869	TGGTCA	CATAAT	7.7	0.1
/pGDH	TGGTCA	CATAAT	82.7	1.0
/p6-2	CGGTCA	CATAAT	33.1	0.4
/p6-4	TGGTCA	TATAAT	225.9	2.7
/p6-3	TTGACA	TATAAT	327.2	4.0
/p6-7	TTGCCA	TATAAT	407.0	4.9
/p6-8	TTGTCA	TATAAT	401.3	4.9

【0015】

上記ATCC 13869/p6-2～ATCC 13869/p6-8は配列番号2～6に対応するものであり、これらの配列は配列番号1記載の配列（野性型）を基に下線部を下記の通り変更したものである。

配列番号1 5' -TTAATTCTTTGTGGTCATATCTGCGACACTGC CATAATTTGAACGT- 3'

配列番号2 CGGTCA CATAAT

配列番号3 TGGTCA TATAAT

配列番号4 TTGACA TATAAT

配列番号5 TTGCCA TATAAT

配列番号6 TTGTCA TATAAT

尚、これらの配列は、直鎖状、2本鎖の合成DNAである。

【0016】

【配列表】

<110> 味の素株式会社

<120> GDH遺伝子用変異型プロモーター配列、該プロモーター配列を持つGDH遺伝子及び該遺伝子を有するコリネバクテリア菌株

<130> Y1E-0624

<160> 6

<210> 1

<211> 46

<212> 核酸

<400> 1

TTAATTCTTT GTGGTCATAT CTGCGACACT GCCATAATT GAACGT

<210> 2

<211> 46

<212> 核酸

<400> 2

TTAATTCTTT GCGGTCATAT CTGCGACACT GCCATAATT GAACGT

<210> 3

<211> 46

<212> 核酸

<400> 3

TTAATTCTTT GTGGTCATAT CTGCGACACT GCTATAATT GAACGT

<210> 4

<211> 46

<212> 核酸

<400> 4

TTAATTCTTT GTTGACATAT CTGCGACACT GCTATAATT GAACGT

<210> 5

<211> 46

<212> 核酸

<400> 5

TTAATTCTTT GTTGCCATAT CTGCGACACT GCTATAATT GAACGT

<210> 6

<211> 46

<212> 核酸

<400> 6

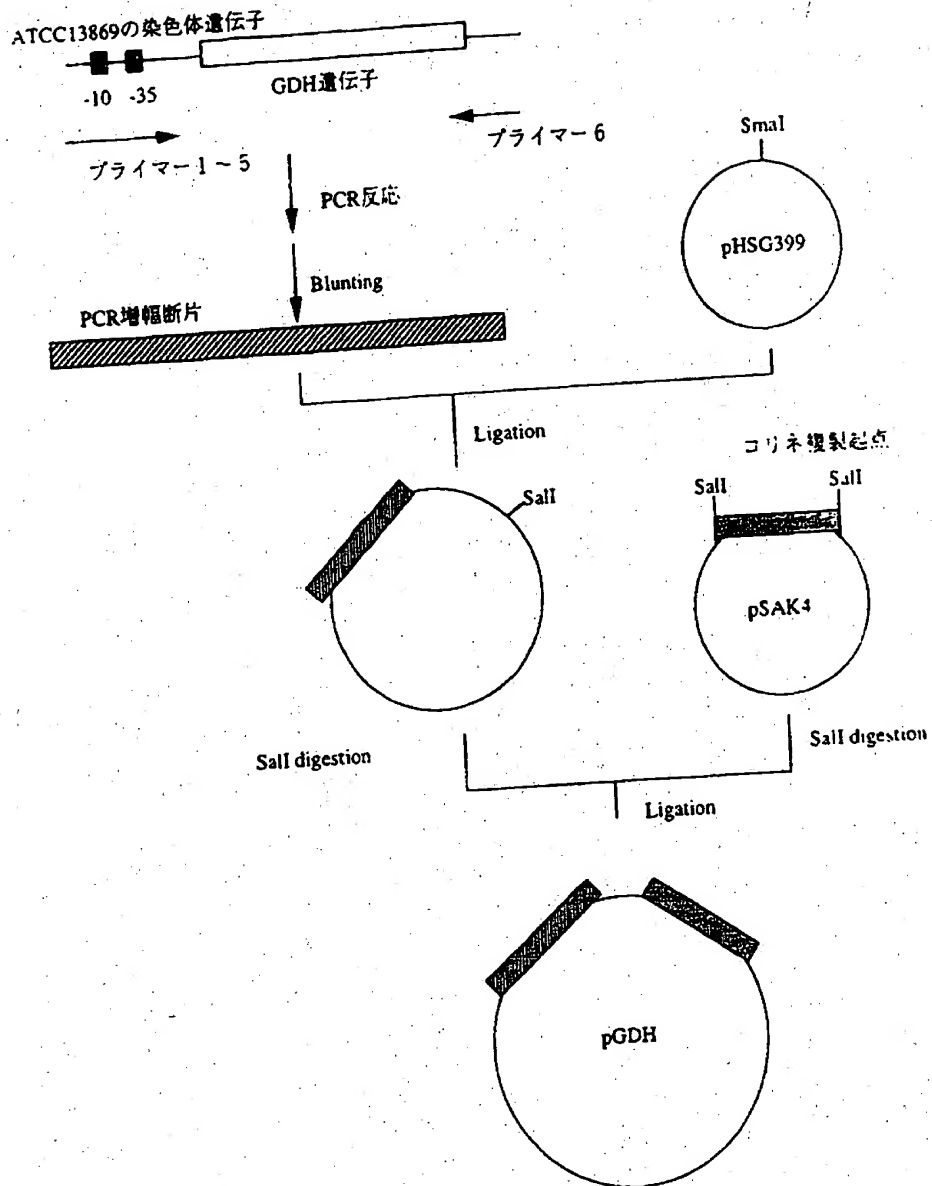
TTAATTCTTT GTTGTCATAT CTGCGACACT GCTATAATTT GAACGT

【図面の簡単な説明】

【図1】 変異型プロモーターを持つGDH遺伝子を運ぶプラスミドの作製フローを示す。

【書類名】 図面

【図1】



各種プロモーターをもつGDH遺伝子の作製

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 副生アスパラギン酸およびアラニンの著しい増加を引き起こすことなく、コリネバクテリア菌株にグルタミン酸を高収率で生産する能力を付与することができるGDH用プロモーターを提供すること。

【解決手段】 -35領域に CGGTCA、TTGTCA、TTGACA及び TTGCCA からなる群から選ばれる少なくとも一種のDNA配列及び／又は-10領域にTATAAT配列若しくは該配列のATAATの塩基が別の塩基で置換されており、プロモーター機能を阻害しない配列を有するグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）産生遺伝子用プロモーター。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000000066

【住所又は居所】

東京都中央区京橋1丁目15番1号

【氏名又は名称】

味の素株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100059959

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】

100067013

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】

100065189

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

矢戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】

100096194

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】

100074228

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】

100084009

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル

中村合同特許法律事務所

【氏名又は名称】

小川 信夫

【選任した代理人】

特平10-271787

【識別番号】 100082821
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル
中村合同特許法律事務所
【氏名又は名称】 村社 厚夫
【選任した代理人】
【識別番号】 100084663
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル
中村合同特許法律事務所
【氏名又は名称】 箱田 篤

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社